

东湖浮游生物群落 DNA 指纹结构及其 与环境理化因子的关系*

宋晓红^{1,2} 余育和^{1**} 冯伟松¹ 颜庆云^{1,2} 邓文娜^{1,2}

(¹ 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; ² 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 对武汉东湖 5 个不同湖区的浮游生物群落 DNA 进行了 RAPD 指纹分析, 并探讨了 DNA 指纹结构与环境理化因子的关系. 结果表明: 所筛选的 9 条随机引物共扩增 210 条大小为 150~2 000 bp 的谱带, 多态率为 93.3%. 各站点平均有 42 条谱带, 其中 IV 站最多(53 条), V 站最少(35 条). I 站的 PO_4^{3-} -P、TP 含量最高, V 站的 NH_4^+ -N、TN、 NO_2^- -N 含量最高, IV 站各理化因子含量均低于其他站点, 站点间 COD、碱度、硬度、钙含量差异不大. 相似性聚类分析表明, 基于 RAPD 标记的浮游生物群落指纹将 5 个站点划分为两类: I、II、III 站聚为一枝, IV、V 站聚为另一枝. 这与湖区主要理化因子的聚类结果一致. 说明东湖不同湖区浮游生物群落 DNA 指纹与其环境理化因子密切相关.

关键词 RAPD 指纹 理化因子 浮游生物群落 东湖

文章编号 1001-9332(2007)12-2860-05 **中图分类号** Q178.1 **文献标识码** A

DNA fingerprinting structure of plankton community and its relations to environmental physical-chemical factors in Donghu Lake. SONG Xiao-hong^{1,2}, YU Yu-he¹, FENG Wei-song¹, YAN Qing-yun^{1,2}, DENG Wen-na^{1,2} (¹*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China*; ²*Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2007, 18(12): 2860–2864.

Abstract: By the method of RAPD fingerprinting, this paper studied the DNA fingerprinting structure of plankton community and its relations to the main environmental physical-chemical factors at five sites in Donghu Lake. From the screened 9 random primers, a total of 210 observable bands with a length of 150–2 000 bp were amplified, 93.3% of which were polymorphic. At the five sites, the average number of amplified bands was 42, with the maximum (53) at site IV and the minimum (35) at site V. The PO_4^{3-} -P and TP contents were the highest at site I, NH_4^+ -N, TN and NO_2^- -N contents were the highest at site V, while the values of all test physical-chemical parameters were the lowest at site IV. No obvious differences in COD, alkalinity, rigidity, and calcium content were observed among the study sites. Similarity clustering analysis showed that the DNA fingerprinting of plankton community based on RAPD marker could cluster the five sites into two groups, i. e., sites I, II and III could be clustered into one group, while sites IV and V could be clustered into another group, which was consistent with the clustering analysis based on the main environmental physical-chemical factors. In conclusion, there was a close relation between the DNA fingerprinting structure of plankton community and the main environmental physical-chemical factors in Donghu Lake.

Key words: RAPD fingerprinting; physical-chemical factors; plankton community; Donghu Lake.

* 国家自然科学基金项目(30570240, 30490232)和国家重点基础研究发展规划资助项目(2002CB412308).

** 通讯作者. E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

2006-09-28 收稿, 2007-08-24 接受.

1 引言

浮游生物(包括浮游植物、浮游动物和细菌)个体微小,在水生态系统中自由漂浮生活.其很多种类对理化环境变动高度敏感以及生活周期短,能够较迅速地以密度和多样性变化反映生态系统的变化,所以浮游生物有机体被认为是水质和水生态系统健康的良好指示生物^[1-2,14].浮游生物数量大、种类组成复杂,在水体生态系统的物质转化、能量流动和信息传递等过程中发挥着至关重要的作用.因此,它们不仅是实验生态学家也是理论生态学家关注的研究对象^[13].

对浮游生物研究的传统方法主要是基于形态学特征的种类鉴定,其耗时多,要求研究者有广博的分类学专业知识,无法区分许多个体微小无显著形态学特征的有机体^[12].这在很大程度上制约了群落多样性及群落功能的研究.分子技术的应用提高了对浮游生物群落多样性的认识,并已成功应用于分析细菌群体及大小在 0.2~3 或 5 μm 的微型浮游生物群落多样性^[4,8-9,11,15].这也有助于比较不同水生态系统群落结构与功能.运用分子方法研究从环境群落中提取的 DNA 遗传信息即为“群落 DNA 分析”^[10].余育和等^[20]以浮游生物为对象,探索了 DNA 指纹分析在群落级生命系统应用的可行性;颜庆云等^[17-19]在此基础上研究了武汉东湖浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化的关系、洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系及长江三峡库区浮游生物 DNA 多态性与物种组成的关系,获知浮游生物群落 DNA 指纹与生物、非生物因子均存在着很好的相关性.但试图对群落组成与生物、理化因素的关系进行综合分析的研究较少.本文运用 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)指纹技术分析浮游生物群落 DNA 多态性量化群落间的差异,探索浮游生物群落 DNA 指纹结构与其生存水体主要理化参数间的相关性,以期评价水环境质量提供依据与支撑,也为今后研究特定水体重要限制性理化因子与浮游生物群落结构及功能的相互作用机理积累资料.

2 材料与方法

2.1 样品采集和处理

采样设在武汉东湖,2006 年 3 月在不同营养水平的水果湖区(I)、郭郑湖区(II)、汤林湖区(III)、牛巢湖区(IV)和后湖(V)设置 5 个采样点

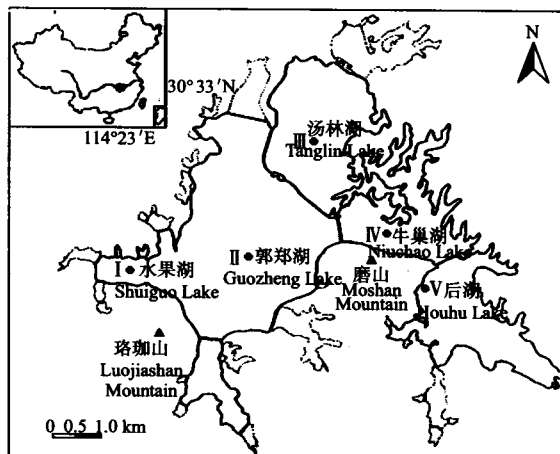


图 1 东湖采样点分布图

Fig. 1 Sampling sites in Donghu Lake.

(图 1).用 25 号浮游生物网(孔径 64 μm)捞取表层浮游生物并收集于 50 ml 塑料瓶,采样后 12 h 内提取浮游生物群落 DNA.采水器采集 1 L 水样用于理化数据测定.

2.2 研究方法

2.2.1 理化指标的测定 理化因子的测量参照《水环境分析方法标准工作手册》和《环境监测技术规范》规定的方法.

2.2.2 DNA 提取 水样经充分混匀后取 1.5 ml,滴加 2~3 滴无水乙醇后,于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,用灭菌双蒸水清洗 3 次,每次清洗后于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,以除去乙醇及粘附在浮游生物体表面的水溶性物质. DNA 提取参照文献[3]:向浮游生物中加入 400 μl 裂解液(0.5% SDS, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA pH = 8.0, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH = 8.0)和蛋白酶 K(终浓度 0.2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$),在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴裂解 5~6 h,间歇振荡混匀.将上清液转入一新离心管,经等体积苯酚:氯仿 3 次抽提后,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 6~7 h,用 70% 乙醇清洗 2 次,干燥后溶于 TE 备用. 0.7% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ EB)电泳检测 DNA 制备效果.

2.2.3 RAPD 扩增 以 II 站 DNA 为模板,并以灭菌双蒸水作为阴性对照,从 Operon 公司的 OPM、OPG 及 OPH 3 组共 60 条引物中筛选出扩增条带清晰、结果稳定的 9 条引物,并对所有 DNA 样品进行 RAPD 扩增.扩增体系参照 Willimas 等^[16].反应体系中除缓冲液外,设计正交实验对其它 4 种成分的最佳使用浓度进行选择.在 25 μl 反应体系中,模板 DNA 约 30 ng(模板含量基本一致),2.5 μl 10 \times PCR buffer, 2 μl 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 3 μl 2 $\text{mmol} \cdot$

$L^{-1}d$ NTP, $0.9 \mu l$ $20 \mu mol \cdot L^{-1}$ 引物, $1.5 U$ Taq 酶, 其余用灭菌双蒸水补齐. 混合后稍作离心使反应混合液沉于管底, 扩增反应在 Pekin Elmer™ 9600 型 PCR 仪上进行: $94^{\circ}C$ 预变性 $10 min$, 后接 40 次循环 (每个循环包含 $94^{\circ}C$ $40 s$, $36^{\circ}C$ $40 s$, $72^{\circ}C$ $3 min$), 最后于 $72^{\circ}C$ 延伸 $10 min$, 反应终止于 $4^{\circ}C$. 以 1.4% 琼脂糖凝胶 (含 $0.5 \mu g \cdot ml^{-1}$ EB) 于 $1 \times TAE$ 中对 PCR 扩增产物电泳 ($75 V$, 约 $1 h$) 分离, Image UVP 凝胶处理系统观察并一次性成像.

2.3 数据处理

各 RAPD 扩增至少重复 2 次, 稳定、清晰的谱带用于最终的数据分析. 根据 DNA Marker DL2 000 指示的标准分子量, 对照反应产物在琼脂糖凝胶上的迁移率和 UVP LabWorks 软件的光密度扫描曲线, 依据统一的标准确定片段大小, 分别以 $1, 0$ 代表扩增位点的有无通过 SPSS 13.0 软件进行聚类分析. 理化数据运用 XLSTAT-Pro 7.5 软件进行主成分分析 (PCA) 及 AHC (agglomerative hierarchical clustering) 聚类分析.

3 结果与分析

3.1 不同湖区水体的理化性质

由表 1 可以看出, 与磷相关的指标 ($PO_4^{3-}-P$ 、TP) I 站含量最高 (0.05 和 $0.11 mg \cdot L^{-1}$), 分别是 IV 站 (含量最低) 的 3 倍多和 2 倍多; 与氮相关的指标 (NH_4^+-N 、TN、 $NO_2^- -N$) V 站含量最高; IV 站各理化因子 ($NO_2^- -N$ 例外) 含量均低于其他站点; 站点间 COD、碱度、硬度及钙含量差异不大.

AHC 聚类分析 (图 2) 结果显示, I 站、II 站优先聚为一类, 相似度约为 22% ; 随后与 III 站聚类, 相似度约为 46% ; IV 站、V 站聚为一类, 相似度约为 55% . 即基于理化数值 I、II、III 站聚为一类, IV、V 站归于另一类. XLSTAT-Pro 7.5 主成分分析 (图 3) 显示水体各理化指标显著正相关.

3.2 随机引物筛选及 RAPD 分析

表 1 水体理化指标测定结果

Tab.1 Result of water physical-chemical factors determined

采样点 Sampling site	氨氮 NH_4^+-N ($mg \cdot L^{-1}$)	总氮 TN ($mg \cdot L^{-1}$)	亚硝酸盐氮 $NO_2^- -N$ ($ug \cdot L^{-1}$)	正磷酸盐 $PO_4^{3-}-P$ ($mg \cdot L^{-1}$)	总磷 TP ($mg \cdot L^{-1}$)	化学需氧量 COD ($mg \cdot L^{-1}$)	二氧化硅 SiO_2 ($mg \cdot L^{-1}$)	碱度 Basicity ($mg \cdot L^{-1}$)	硬度 Rigidity	钙 Calcium ($mg \cdot L^{-1}$)
I	0.45	1.18	15.33	0.05	0.11	4.91	4.36	120.12	9.70	48.71
II	0.37	0.82	6.07	0.04	0.09	4.91	4.40	120.12	9.82	49.54
III	0.26	0.80	6.59	0.02	0.05	4.28	2.72	115.12	9.36	49.54
IV	0.22	0.62	8.15	0.02	0.05	4.28	0.60	115.12	8.66	37.15
V	0.65	1.68	26.27	0.02	0.06	4.91	4.70	110.11	9.47	42.93

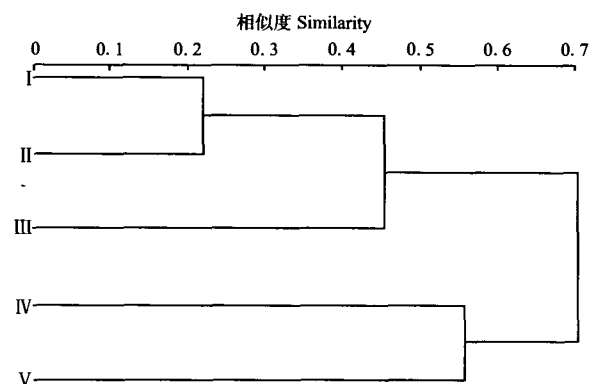


图 2 水体理化参数的 AHC 聚类分析

Fig.2 AHC clustering based on water physical-chemical factors.

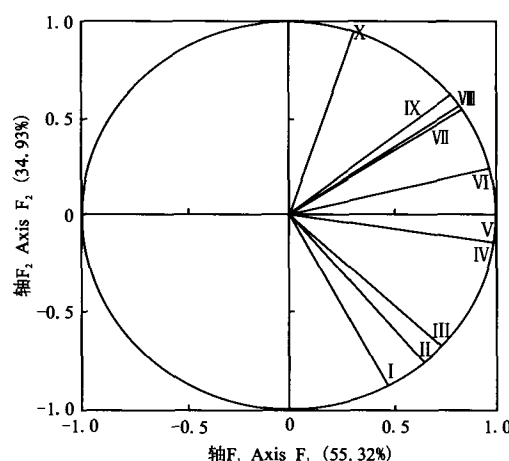


图 3 水体理化参数的主成分分析结果

Fig.3 Result of PCA based on water physical-chemical factors.

I: 亚硝酸盐氮 $NO_2^- -N$; II: 总氮 TN; III: 氨氮 NH_4^+-N ; IV: 二氧化硅 SiO_2 ; V: 化学需氧量 COD; VI: 硬度 Hardness; VII: 总磷 TP; VIII: 正磷酸盐 $PO_4^{3-}-P$; IX: 钙 Calcium; X: 碱度 Basicity.

由表 2 可以看出, 筛选出的 9 条引物共扩增 210 条片段大小为 $150 \sim 2000 bp$ 的可视条带, 其中 93.3% 为多态性带, 17.1% 为特有带 (只在一个站点出现). 平均每个站点扩增 42 条谱带, 其中 IV 站最多 (53 条), V 站最少 (35 条). 5 站共有带 6 条, IV 站特有带最多 (17 条), I 站最少 (2 条).

基于 RAPD 标记的聚类 (图 4) 显示, II、III 站优

表 2 随机引物及 RAPD 扩增结果

Tab. 2 Random primers and the RAPD amplified results

引物 Primer	碱基序列 5'-3' Nucleotide sequence	有效条 带数 Number of bands	扩增片段长 度范围 Sizes of amplified bands (bp)	谱带多 态率 Polymorphic rate (%)
OPG-10	AGGGCCGTCT	28	300 ~ 1800	100
OPG-13	CTCTCCGCCA	40	400 ~ 2000	76.9
OPG-16	AGCGTCCTCC	26	400 ~ 1500	90
OPM-18	CACCATCCGT	19	400 ~ 1000	100
OPM-20	AGGTCTTGGG	15	500 ~ 2000	83.3
OPH-12	ACGCGCATGT	25	250 ~ 1000	100
OPH-13	GACGCCACAC	26	250 ~ 1200	90
OPH-17	CACTCTCCTC	15	750 ~ 2000	100
OPH-18	GAATCGGCCA	25	500 ~ 1800	100

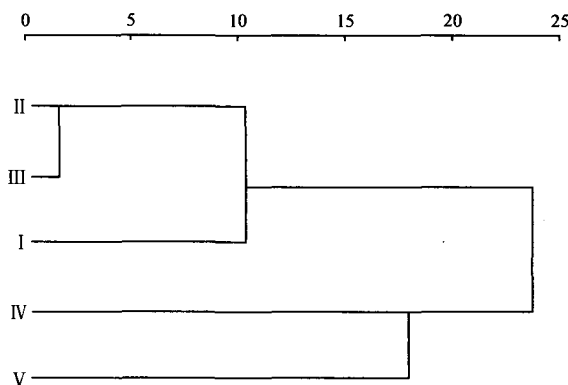


图 4 东湖各采样点浮游生物群落聚类图

Fig. 4 Clustering of plankton community from five sampling sites in Donghu Lake.

先聚类,并在距离 10.5 附近与 I 站相聚类;IV、V 站在距离 16.5 附近聚为一类。与理化数值的聚类结果基本吻合。

4 讨 论

生物群落有其特定的物种组成,而各物种具有其区别于其它物种的特定 DNA 碱基序列。所以,理论上可以认为,分子方法建立的群落指纹图谱所揭示的群落结构与形态层面的物种组成应该是相吻合的。随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术通过较短的引物(通常为 10 碱基)对基因组 DNA 进行随机扩增。由于引物对物种没有选择性,因此能对群落结构提供整体扫描^[5]。由于其独特的检测 DNA 多态性的方式以及快速、简便的特点,该技术已渗透于基因组研究的各个方面。

余育和等^[20]研究表明,物种组成与群落 DNA 多态性及环境因子密切相关。因此,越过物种组成直接探讨群落 DNA 指纹图谱与水体理化因子的关系理论上是可行的。鉴于 RAPD 谱带的亮度可能受

PCR 扩增、电泳条件等诸多因素的影响,因此本研究仅考虑了谱带的有无这一参数来进行 RAPD 指纹的数据分析。理化分析结果表明,I、II、III 站环境条件相似,尤其是 I、II 站差异较小;IV、V 站相似程度较高(图 3)。这与甘义群等^[6]、雷安平等^[7]对东湖富营养化状况的研究结果相一致。基于 RAPD 标记的聚类(图 4)和理化因子的聚类结果基本吻合:I、II、III 站聚为一枝,IV、V 站聚为另一枝。说明浮游生物群落 DNA 指纹结构能从生物角度较好地揭示水环境状况的差异。理化分析显示 I、II 站理化条件更为接近,基于群落 DNA 的 RAPD 标记结果显示 II、III 站优先聚类,随后与 I 站聚为一类。其原因可能是 I 站中的某种或几种优势种的 DNA 由于模板竞争掩盖了其它相对较少或稀有的物种(I 站的特有带最少,仅 2 条)。

综上所述,RAPD 指纹能较好地揭示东湖不同营养水平湖区浮游生物群落组成的差异,并且群落 DNA 指纹结构与湖区环境主要理化因子密切相关。当然,整个水体生态系统中生物与非生物环境间的关系错综复杂,其中非生物环境(通常以各种理化指标显示)是决定水生生物生物量、群落结构及其演变的重要因子。但单凭理化参数不能反映水体的整体状况,运用不同的 DNA 指纹分析技术并结合环境理化状况及生物因素进行综合分析,建立浮游生物群落 DNA 指纹结构与其环境因子的关系模型,能为水环境质量评价积累分子层面的资料,并进而能为水资源管理提供依据。

参考文献

- [1] Beisner BE. 2001. Plankton community structure in fluctuating environments and the role of productivity. *Oikos*, **95**: 496-510
- [2] Bianchi F, Aari FB, Berton A, et al. 2003. Can plankton communities be considered as bio-indicators of water quality in the Lagoon of Venice? *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 964-971
- [3] Chui LW, King R, Lu P, et al. 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **48**(1): 39-45
- [4] Diez B, Pedros Alio C, Massana R. 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(7): 2932-2941
- [5] Franklin RB, Taylor DR, Mills AL. 1999. Characterization of microbial communities using randomly ampli-

- fied polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, **35**(3): 225–235
- [6] Gan Y-Q (甘义群), Guo Y-L (郭永龙). 2004. The actuality and treatment about eutrophication in Lake Donghu, Wuhan. *Resources and Environment in the Yangtze Basin* (长江流域资源与环境), **14**(3): 277–281 (in Chinese)
- [7] Lei A-P (雷安平), Shi Z-X (施之新), Wei Y-X (魏印心). 2003. The study of the diversity of phytoplanktons in Donghu Lake. *Acta Hydrobiologica Sinica* (水生生物学报), **12**(27): 180–184 (in Chinese)
- [8] López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, *et al.* 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, **409**: 603–607
- [9] Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaulot D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**: 607–610
- [10] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. *Research in Microbiology*, **151**(3): 167–177
- [11] Rappe MS, Suzuki MT, Vergin KL, *et al.* 1998. Phylogenetic diversity of ultraplankton plastid small-subunit rRNA genes recovered in environmental nucleic acid samples from the Pacific and Atlantic coasts of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(1): 294–303
- [12] Savin MC, Martin JL, LeGresley M, *et al.* 2004. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial Ecology*, **48**(1): 51–65
- [13] Scheffer M, Rinaldi S, Huisman J, *et al.* 2003. Why phytoplankton communities have no equilibrium: Solutions to the paradox. *Hydrobiologia*, **491**: 9–18
- [14] Ternjej I, Tomec M. 2005. Plankton community and related environmental factors in the oligotrophic Lake Vrana. *Periodicum Biologorum*, **107**(3): 321–328
- [15] Van Hannen EJ, Van Agterveld MP, Gons HJ, *et al.* 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Phycology*, **34**(2): 206–213
- [16] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, *et al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 6531–6535
- [17] Yan Q-Y (颜庆云), Yu Y-H (余育和), Feng W-S (冯伟松), *et al.* 2005. Corresponding relations between DNA fingerprinting topological structure and species composition of plankton community in Dongting Lake. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **25**(9): 2221–2226 (in Chinese)
- [18] Yan QY, Yu YH, Feng WS, *et al.* 2006. DNA polymorphism of the plankton community and its relationship to species composition in the Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River. *Journal of Freshwater Ecology*, **21**(3): 385–390
- [19] Yan Q-Y (颜庆云), Yu Y-H (余育和), Zhang W-J (张文静). 2005. The DNA polymorphism of plankton community and eutrophication in Lake Donghu, Wuhan. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **25**(3): 461–465 (in Chinese)
- [20] Yu Y-H (余育和), Zhang W-J (张文静), Yan Q-Y (颜庆云). 2004. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community level life system. *Acta Hydrobiologica Sinica* (水生生物学报), **28**(5): 457–463 (in Chinese)

作者简介 宋晓红,女,1983年生,硕士研究生.主要从事浮游生物分子生态学研究. E-mail: sxh1125@126.com

责任编辑 肖红
